

509,255

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
9 octobre 2003 (09.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/082307 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 35/74, A23L 1/03, A61P 1/00, 29/00

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.;
Cabinet Ores, 36, rue de St-Petersbourg, F-75008 Paris
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00903

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 21 mars 2003 (21.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/03891 28 mars 2002 (28.03.2002) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-
versité, F-75007 PARIS (FR).

Publiée :

~~avec rapport de recherche internationale~~
~~avant l'expiration du délai prévu pour la modification des~~
~~revendications, sera republiée si des modifications sont re-~~
~~çues~~

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FIO-
RAMONTI, Jean [FR/FR]; 21, rue de la Garonne,
F-31120 ROQUETTES (FR). BUENO, Lionel [FR/FR];
1 Chemin de Laubarède, F-31840 AUSSONNE (FR).
THEODOROU, Vassilia [FR/FR]; 12, rue Roudoulengue,
F-31120 PORTET-SUR-GARONNE (FR). LAMINE,
Florence [FR/FR]; 9, rue Dr Victor Schoelcher, F-31100
TOULOUSE (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF LACTOBACILLUS FARCIMINIS FOR THE PREVENTION OR PATHOLOGY OF DIGESTIVE PATHO-
LOGIES

(54) Titre : UTILISATION DE LACTOBACILLUS FARCIMINIS POUR LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT DE PATHO-
LOGIES DIGESTIVES.

(57) Abstract: The invention relates to the use of lactic bacteria of the species *Lactobacillus farciminis* for the treatment or preven-
tion of a pathology of the digestive tube, especially an acute or chronic inflammatory pathology of the intestine.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation de bactéries lactiques de l'espèce *Lactobacillus farciminis* pour le trai-
tement ou la prévention d'une pathologie du tube digestif, en particulier d'une pathologie inflammatoire aiguë ou chronique de
l'intestin.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/082307 A1

UTILISATION DE LACTOBACILLUS FARCIMINIS POUR
LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIGESTIVES

La présente invention concerne l'utilisation de la bactérie lactique *Lactobacillus farciminis* pour la
5 prévention ou le traitement de pathologies digestives, notamment fonctionnelles et/ou inflammatoires.

De nombreuses pathologies du tube digestif, et en particulier de l'intestin, impliquent à un degré plus ou moins important, des phénomènes inflammatoires. Parmi ces
10 pathologies, on citera notamment :

- les maladies inflammatoires chroniques intestinales, qui englobent principalement la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique constituent une pathologie de prévalence faible, mais toutefois en
15 augmentation. Ces maladies, très invalidantes, sont caractérisées par des poussées inflammatoires de gravité variable avec des phases de rémission parfois prolongées. La thérapeutique actuelle est principalement basée sur l'administration de corticordes, de 5-ASA (acide 5-amino-

20 salicylique), la chirurgie dans les cas les plus graves. Des traitements avec certaines cytokines ont été proposés, mais ils sont encore au stade expérimental, et demeurent onéreux ;

- les troubles fonctionnels digestifs (TFD), qui constituent une pathologie à faible morbidité mais de très
25 forte prévalence. La douleur viscérale est le principal symptôme, mais d'autres symptômes digestifs (diarrhée, constipation ou alternance des deux) ou extra digestifs (fatigue) sont souvent associés. Sa physiopathologie reste imprécise (altérations de la motricité gastro-intestinale, implications de facteurs psychosociaux, séquelles
30 d'inflammation digestive ou de chirurgie), mais l'hypersensibilité douloureuse à la distension de la paroi digestive est une caractéristique principale de cette pathologie. L'origine de cette hypersensibilité n'est pas
35 connue bien qu'une origine inflammatoire ait été supposée du fait de la prolongation des TFD pendant plusieurs mois chez

une forte proportion de patients atteints d'une gastroentérite aiguë, et par la mise en évidence de séquelles inflammatoires (hyperplasie des mastocytes) dans des muqueuses digestives de patients présentant des TFD.

5 Différentes équipes ont rapporté l'efficacité de microorganismes probiotiques dans le cadre du traitement de ces pathologies du tube digestif. On regroupe sous l'appellation « probiotiques », des microorganismes vivants de différentes familles, genres et espèces, qui, lorsqu'ils
10 sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé, allant au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

Des études montrant l'efficacité de probiotiques dans le traitement d'inflammations digestives expérimentales
15 ont ainsi été réalisées avec *Lactobacillus reuteri* (FABIA et al., Scand. J. Gastroenterol., 28, 155-162, 1993 ; HOLMA et al., Scand. J. Gastroenterol., 36, 630-635, 2001) et *Lactobacillus plantarum* (MAO et al., Gastroenterology, 111,
334-344, 1996). Récemment, une étude chez l'homme a montré
20 l'efficacité de *Saccharomyces boulardii* dans la prévention de la récurrence de la maladie de Crohn (GUSLANDI et al., Dig. Dis. Sci., 45, 1462-1464, 2000). D'autres probiotiques ont également montré une efficacité dans le traitement de la rectocolite hémorragique : *Escherichia coli* Nissle (KRUIS et
25 al., Aliment. Pharmacol. Ther., 11, 853-858, 1997 ; REMBACKEN et al., Lancet, 354, 635-639, 1999), une association de souches de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (VENTURI et al., Aliment. Pharmacol. Ther., 13, 1103-1108, 1999) et une association *Bifidobacterium bifidum*,
30 *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus* (ISHIKAWA et al., Gastroenterology, 118, 4171, 2000).

En ce qui concerne les troubles fonctionnels digestifs, et le syndrome de l'intestin irritable, les résultats sont moins probants : une étude a montré que
35 *Saccharomyces boulardii* réduisait la diarrhée associée aux troubles fonctionnels digestifs mais n'affectait pas les

autres symptômes (MAUPAS et al., Méd. Chir. Dig., 12, 77-79, 1983), et une autre étude rapporte l'inefficacité d'une association de souches de *Lactobacillus* et d'*Escherichia coli* dans le traitement de la dyspepsie non ulcéreuse (HENTSCHEL et al., Gastroenterology, 112 Suppl 1, A146, 1997) ; des effets positifs de *Lactobacillus plantarum* sur plusieurs symptômes du syndrome de l'intestin irritable (flatulence, douleur abdominale) ont été observés, mais ces effets sont similaires à ceux d'un placebo pour le critère de la douleur abdominale (NOBAEK et al., Am. J. Gastroenterol., 95, 1231-1238, 2000) ; une autre étude portant sur trois des symptômes du syndrome de l'intestin irritable (douleur, « urgence toilette », ballonnements) rapporte l'absence d'effet de *Lactobacillus casei* CG (O'SULLIVAN et al., Dig. Liver Dis., 32, 294-301, 2000).

Il apparaît donc que l'utilisation de microorganismes probiotiques pour le traitement de pathologies inflammatoires du tube digestif constitue une approche prometteuse, mais dont l'efficacité apparaît variable, à la fois selon l'espèce de micro-organisme utilisé, et selon la pathologie ou le symptôme pathologique concerné. Il est donc souhaitable d'identifier d'autres microorganismes utilisables dans ce but, afin d'élargir la gamme des possibilités thérapeutiques.

Les Inventeurs ont maintenant découvert que des bactéries lactiques du genre *farciminis* de l'espèce *Lactobacillus* étaient actives *in vivo* sur l'inflammation du tube digestif, et notamment du colon, ainsi que sur la douleur viscérale. Les Inventeurs ont constaté que l'activité anti-inflammatoire de *Lactobacillus farciminis* était due à la production *in situ* dans la lumière digestive de monoxyde d'azote (NO) par cette bactérie.

Lactobacillus farciminis appartient au groupe I (homofermentaire stricte) de l'espèce *Lactobacillus*. Elle est fréquemment rencontrée dans différents produits alimentaires tels que les produits carnés, notamment les saucisses, et le

levain de panification (DE ROISSARD et LUQUET, Bactéries lactiques, Volume I : Aspects fondamentaux et technologiques, Lorica, 1998). La production de monoxyde d'azote en culture par *Lactobacillus farciminis* a été rapportée par WOLF et al.,
5 Int. J. Food Microbiol., 10, 323-329, 1990.

Un rôle potentiel du monoxyde d'azote dans la régulation des fonctions digestives et/ou la protection de la muqueuse digestive a été suggéré par différentes observations. On sait que certaines cellules de l'épithélium
10 intestinal peuvent produire du monoxyde d'azote, après induction par certaines cytokines pro-inflammatoires et/ou par les toxines lipopolysaccharidiques (LPS) de bactéries entéroinvasives (WITTHOFT et al., Am. J. Physiol., 275, G564-571, 1998). Ce monoxyde d'azote endogène, participerait, par
15 ses propriétés antimicrobiennes, à la défense contre les microorganismes pathogènes. Il participerait également, lorsqu'il est produit en faibles quantités, à la protection de la muqueuse intestinale. Cependant, en quantités plus
importantes, il contribuerait à l'instauration et à
20 l'entretien d'un état inflammatoire chronique (ALICAN et KUBES, Am. J. Physiol. 270, G225-237, 1996 ; TEPPERMAN et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 271, 1477-1482, 1994).

En ce qui concerne le monoxyde d'azote exogène (c'est à dire provenant de l'alimentation ou d'une
25 administration médicamenteuse), les effets observés sont également contradictoires ; un effet protecteur transitoire de donneurs de NO vis-à-vis de lésions induites par l'éthanol sur la muqueuse gastrique a été observé (MAC NAUGHTON et al., Life Sci., 45, 1869-1876, 1989), de même qu'un effet
30 protecteur vis-à-vis de lésions induites par l'acide chlorhydrique (KITAGAWA et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 253, 1133-1137, 1990);. D'autres travaux ont montré que la perfusion intra-artérielle locale de donneurs de NO peut induire des effets variables vis-à-vis d'altérations
35 hémorragiques de la muqueuse gastrique : un effet protecteur, une absence d'effet ou un effet délétère peuvent être

observés, selon la nature du donneur de NO et la dose utilisée (LOPEZ-BELMONTE et al., Br. J. Pharmacol., 108, 73-78, 1993).

On connaît actuellement quelques microorganismes probiotiques dont les effets apparaissent dus, au moins en partie, à une influence sur la production de NO endogène. La Demande PCT WO 00/28943 montre que certaines souches de bactéries lactiques, et notamment de *Lactobacillus casei*, peuvent avoir une action anti-inflammatoire en augmentant la production de monoxyde d'azote par les entérocytes activés par des cytokines pro-inflammatoires, et en diminuant au contraire la production de monoxyde d'azote par les entérocytes activés par des cytokines pro-inflammatoires et des lipopolysaccharides bactériens. KORHONEN et al. (Inflammation, 25, 223-232, 2001) montrent que la souche GG de *Lactobacillus rhamnosus*, qui est active sur des diarrhées virales ou induites par les antibiotiques, peut augmenter la production de monoxyde d'azote par des cellules épithéliales intestinales ou des macrophages activés par des cytokines pro-inflammatoires, et indiquent que cet effet sur la production de NO pourrait être impliqué dans l'activité de *Lactobacillus rhamnosus*.

Les éventuels effets probiotiques de microorganismes directement producteurs de monoxyde d'azote n'ont été que très peu étudiés. La Demande PCT WO 98/27991 propose l'utilisation de bactéries du genre *Propionobacter*, productrices de monoxyde d'azote pour l'obtention d'une composition produisant des quantités physiologiquement significatives de NO dans le tube digestif, et rapporte un effet de cette composition sur la motricité intestinale. Ce document mentionne également *Lactobacillus farciminis*, mais pour en exclure l'utilisation, sur la base d'essais expérimentaux en culture d'où il est conclu que la quantité de NO produite par *L. farciminis* est trop faible pour être significative.

Contrairement à ce qui était indiqué dans la Demande PCT WO 98/27991, les Inventeurs ont maintenant établi que *L. farciminis* produit, dans le tube digestif, une quantité de monoxyde d'azote lui permettant d'exercer un effet thérapeutique, notamment un effet anti-inflammatoire, et un effet sur la douleur liée à la distension viscérale.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une bactérie lactique de l'espèce *Lactobacillus farciminis* pour l'obtention d'une composition destinée au traitement ou à la prévention de pathologies du tube digestif.

La souche type de *L. farciminis* qui a été utilisée dans le cadre des expérimentations qui ont conduit à la présente invention est connue en elle même et accessible dans différentes collections ; elle est par exemple référencée sous les numéros d'accès suivants : CIP-103136T, ATCC 29644, DSM 20184, JCM 1097, LMG 9200, NCDO 2330, NCIB 11717, IMET 11462. On peut également utiliser, pour la mise en œuvre de la présente invention, des souches de *L. farciminis* isolées à partir de produits alimentaires contenant cette bactérie.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ladite composition est destinée au traitement de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques du tube digestif, et notamment de l'intestin.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ladite composition est destinée au traitement ou à la prévention de la douleur viscérale.

A titre d'exemples de pathologies pour le traitement desquelles la présente invention peut être mise en œuvre, on citera les colites, les entérites, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, les troubles fonctionnels digestifs (syndrome de l'intestin irritable et dyspepsie non-ulcéreuse), etc.

De préférence, ladite composition est destinée à l'administration par voie orale.

Elle peut comprendre une ou plusieurs souches de *L. farciminis*, dans n'importe quelle formulation permettant de conserver ces bactéries viables, pendant les différentes étapes de leur conditionnement et de leur stockage, et après
5 leur ingestion, jusqu'à leur site d'action dans le tube digestif.

Elle peut également comprendre éventuellement d'autres bactéries lactiques, possédant ou non des propriétés probiotiques, par exemple à des bactéries telles que les
10 lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les bifidobactéries, et/ou d'autres microorganismes probiotiques, tels que des levures.

Dans le cadre de la présente invention, les compositions comprenant *L. farciminis* peuvent être
15 administrées sous forme d'aliments. Il peut s'agir par exemple de produits fermentés tels que des produits laitiers ; dans ce cas, *L. farciminis* peut faire partie du ferment mis en œuvre pour l'obtention de ces produits, ou bien être ajoutée à ceux-ci après fermentation. Elles peuvent
20 également être administrées sous forme de compléments alimentaires à incorporer dans l'alimentation, ou à ingérer directement. Avantageusement, elles peuvent être conditionnées sous forme de doses individuelles renfermant la quantité de *L. farciminis* souhaitée.

25 Pour la mise en œuvre de la présente invention, *L. farciminis* sera de préférence administré à raison d'au moins 10^6 UFC (unités formant colonie)/jour, avantageusement au moins 10^8 UFC/jour, et de manière tout a fait préférée au moins 10^{10} UFC/jour, en une ou plusieurs prises.

30 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant les propriétés d'une souche de *Lactobacillus farciminis* vis à vis d'une inflammation colique et de la douleur viscérale à la
35 distension.

EXEMPLE 1 : EFFET D'UN TRAITEMENT PAR LACTOBACILLUS FARCIMINIS SUR UNE INFLAMMATION COLIQUE INDUITE PAR LE TNBS/ETHANOL : ROLE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO)

Une inflammation colique (ou colite) peut être induite expérimentalement par l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS), qui constitue le modèle d'inflammation expérimentale colique le plus courant et le mieux validé (MORRIS et al., Gastroenterology, 96, 795-803, 1989).

Cette colite se caractérise par une augmentation de l'activité myéloperoxydase (MPO), un marqueur du degré d'infiltration de polynucléaires neutrophiles dans la muqueuse colique, ainsi que par l'augmentation du score lésionnel macroscopique (SLM) prenant en compte la gravité et l'étendue des lésions macroscopiques apparues, la présence et la gravité des adhérences et la présence ou non de diarrhée dans le côlon.

Les effets d'un traitement par un donneur de monoxyde d'azote, le nitroprussiate de sodium (SNP), ou par *L. farciminis* sur une colite induite par le TNBS chez le rat ont été comparés. Par ailleurs, le rôle effectif du monoxyde d'azote exogène dans ces effets, a été évalué en utilisant un piègeur de NO, l'hémoglobine (Hb).

Pour l'étude des effets du SNP, 7 lots de rats WISTAR de 200-250 grammes sont équipés, sous anesthésie, d'un cathéter intracolique (+ 2cm de la jonction caeco-colique) extériorisé au niveau de la région dorso-scapulaire. A J+5, les rats reçoivent une instillation intracolique de 80 mg/kg/jour de TNBS/éthanol (lots 4-7) ou d'une solution NaCl 0,9% (lots 1-3). 4 heures après l'instillation, les rats sont perfusés à un débit de 250 µl/heure avec 1 mg/kg/jour de SNP (lots 2 et 5), ou 200 mg/kg/jour d'Hb (lots 3 et 7), ou un mélange SNP + Hb (lot 6), ou une solution NaCl 0,9% (lots 1 et 4), pendant 4 jours.

Pour l'étude des effets de *L. farciminis*, 5 lots de 10 rats mâles WISTAR de 200-250 grammes reçoivent par voie

orale 10^{12} UFC/jour de *L. farciminis* (lots 2, 4, 5) ou une solution NaCl 0,9% (lots 1, 3), pendant 19 jours. A J+10, les rats sont équipés d'un cathéter intracolique tel que précédemment décrit. A J+15, les rats reçoivent par voie intracolique 80 mg/kg de TNBS/éthanol (lots 3-5) ou une solution NaCl 0,9% (lots 1, 2). 4 heures après l'instillation, les rats reçoivent une perfusion intracolique d'Hb, à 200 mg/kg/jour (lot 5) ou d'une solution NaCl 0,9% (lots 1-4), pendant 4 jours.

A J+19, tous les rats sont sacrifiés et l'intensité de l'inflammation de la paroi du côlon est caractérisée par l'activité myéloperoxydase (MPO) et le score lésionnel macroscopique (SLM), sur des échantillons coliques isolés.

I- Activité myéloperoxydase (MPO)

L'activité myéloperoxydase (MPO) est déterminée, sur des échantillons coliques isolés, selon le protocole décrit par BRADLEY et al., (J. Invest. Dermatol., 78, 206-209, 1982).

Ce protocole peut être résumé comme suit :

Les segments de côlon (1 cm de long) sont immergés dans du tampon phosphate (50 mM, pH 6). Après lyse mécanique sur glace à l'aide d'un homogénéiseur POLYTRON, 3 cycles de congélation (azote liquide, 1 min) et de décongélation (bain-marie, 37°C, 10 min) sont réalisés. Après centrifugation, (10000 rpm, 15 min, 4°C), le culot est repris dans du bromure d'hexadécyl triméthylammonium (HTAB) 0,5%. Les échantillons sont ensuite soniqués avant de subir une nouvelle centrifugation. Le surnageant est récupéré en vue des dosages de l'activité MPO et des protéines totales.

L'activité MPO est déterminée par spectrophotométrie. L'échantillon est mis en présence de tampon phosphate contenant du dihydrochlorure de O-dianisidine (0,167 mg/ml) et du peroxyde d'hydrogène 0,0005%. Les changements d'absorbance (450 nm, 25°C) ont été déterminés par spectrophotométrie cinétique de 2 minutes,

d'après l'équation bilan de la réaction enzymatique catalysée par la MPO : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- = \text{H}_2\text{O} + \text{HOCl}$ (coloration orangée), et ramenés en unités MPO.

Une unité d'activité MPO est définie comme la
5 quantité de MPO dégradant 1 μmol de peroxyde d'hydrogène par minute par millilitre à 25°C. La concentration en protéines (grammes/ml) est déterminée à l'aide d'un kit commercial (Detergent Compatible Assay, Bio Rad, Ivry/Seine, France). L'activité MPO est exprimée sous forme d'unités MPO par
10 gramme de protéines (U MPO/g de protéines).

1) Traitement par le SNP

Les résultats sont présentés dans la Figure 1.

Légende de la Figure 1 :

En abscisse

- 15 □ = rats non traités (lot 1)
 ■ = rats traités par SNP (lot 2)
 ▣ = rats traités par Hb (lot 3)
 ■ = rats traités par TNBS/éthanol (lot 4)
 ▤ = rats traités par TNBS/éthanol + SNP (lot 5)
20 ▥ = rats traités par TNBS/éthanol + SNP + Hb (lot 6)
 ■ = rats traités par TNBS/éthanol + Hb (lot 7)

En ordonnée = activité MPO (U MPO/g de protéines)

- 25 * : significativement différente ($P < 0,01$) du lot témoin (lot 1)
 + : significativement différente ($P < 0,01$) du lot TNBS/éthanol (lot 4)

L'activité MPO de la paroi du côlon chez les rats
contrôles (lot 1) et ceux traités par le SNP (lot 2) ou l'Hb
30 (lot 3), en l'absence d'instillation de TNBS/éthanol est respectivement de 263 ± 103 ; 351 ± 88 ; 426 ± 117 U MPO/g de protéines. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes entre elles. L'instillation de TNBS/éthanol (lot 4) augmente de façon significative l'activité MPO par rapport
35 aux rats contrôles (5346 ± 714 U MPO/g de protéines). La perfusion de SNP chez les rats instillés au TNBS/éthanol (lot

5) diminue significativement l'activité MPO (2619 ± 447 U MPO/g de protéines) par rapport aux rats ayant seulement reçu une instillation de TNBS/éthanol. La perfusion conjointe de SNP et d'Hb chez les rats instillés au TNBS/éthanol (lot 6) abolit la réduction de l'activité MPO induite par le SNP (4710 ± 645 U MPO/g de protéines), aucune différence significative n'apparaissant par rapport aux rats instillés au TNBS/éthanol (lot 4 ; 5346 ± 714 U MPO/g de protéines).

2) Traitement par *L. farciminis*

10 Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

Légende de la Figure 2 :

En abscisse

□ = rats non traités (lot 1)

▣ = rats traités par *L. farciminis* (lot 2)

15 ■ = rats traités par TNBS/éthanol (lot 3)

▤ = rats traités par *L. farciminis* + TNBS/éthanol (lot 4)

▥ = rats traités par *L. farciminis* + TNBS/éthanol + Hb (lot 5)

20 En ordonnée = activité MPO (U MPO/g de protéines)

* : significativement différente ($P < 0,01$) du lot témoin (lot 1)

+ : significativement différente ($P < 0,01$) du lot TNBS/éthanol (lot 3)

25 Les rats contrôles non traités (lot 1) ont une activité MPO de 237 ± 53 U MPO/g de protéines.

L'instillation de TNBS/éthanol induit une inflammation colique caractérisée par une augmentation de l'activité MPO (lot 3 ; 3400 ± 395 U MPO/g de protéines). Le traitement par *L. farciminis* n'a pas d'effet sur l'activité MPO chez les rats instillés avec la solution saline (lot 2 ; 256 ± 31 U MPO/g de protéines). Au contraire, chez les rats instillés au TNBS/éthanol, le traitement par *L. farciminis* diminue de façon significative l'activité MPO (lot 4 ; 905 ± 211 U MPO/g de protéines). La perfusion d'hémoglobine abolit la réduction de l'inflammation par *L. farciminis* chez

les rats instillés au TNBS/éthanol (lot5 ; 2246 ± 566 U MPO/g de protéines).

II- Score lésionnel macroscopique (SLM)

- 5 Le score lésionnel macroscopique (SLM) est déterminé sur des échantillons coliques isolés tel que décrit par WALLACE et al., (Gastroenterology, 102, 18-27, 1992) d'après la grille d'évaluation ci-dessous :

Paramètre	Score
Ulcération	
Apparence normale	0
Hyperémie focale sans ulcération	1
Ulcération sans hyperémie ou épaissement de la muqueuse	2
Ulcération à 1 site inflammatoire	3
Ulcération à 2 sites inflammatoires ou plus	4
Plusieurs sites inflammatoires sur plus de 1 cm	5
Aire inflammatoire >2cm, score augmenté de 1 à chaque cm ulcéré	6-10
Adhésion	
Pas d'adhérence	0
Adhérence légère	1
Adhérence forte	2
Diarrhée	
Non	0
Oui	1
Score total	

1) Traitement par le SNP

- 10 Les résultats sont illustrés par la Figure 3.

Légende de la Figure 3 :

En abscisse

■ = rats traités par TNBS/éthanol (lot 4)

▣ = rats traités par TNBS/éthanol + SNP (lot 5)

- 15 ▤ = rats traités par TNBS/éthanol + SNP + Hb (lot 6)

■ = rats traités par TNBS/éthanol + Hb (lot 7)

En ordonnée = scores lésionnels macroscopiques

- 20 * : significativement différent ($P < 0,01$) du lot témoin (lots 1-3)

4 jours après l'instillation de TNBS/éthanol, la muqueuse colique se caractérise par une importante ulcération associée à une inflammation régulière et une épaisseur de paroi correspondant à un SLM de $6,9 \pm 1,7$ (lot 4). Le

traitement journalier par le SNP réduit de façon significative l'étendue de la lésion colique, diminuant le SLM à $2,5 \pm 0,6$ (lot 5), alors que le traitement journalier avec le SNP + Hb et Hb seul n'a pas d'effet sur ce paramètre avec des SLM respectifs de $5,0 \pm 1,1$ (lot 6) et $5,8 \pm 1,3$ (lot 7).

2) Traitement par *Lactobacillus farciminis*

Les résultats sont illustrés par la Figure 4.

Légende de la Figure 4 :

En abscisse

■ = rats traités par TNBS/éthanol (lot 3)

▣ = rats traités par *L. farciminis* + TNBS/éthanol (lot 4)

▤ = rats traités par *L. farciminis* + TNBS/éthanol + Hb (lot 5)

En ordonnée = scores lésionnels macroscopiques

* : significativement différent ($P < 0,01$) du lot témoin (lots 1 et 2)

Par rapport aux rats contrôles considérés comme dépourvus de lésions macroscopiques (lots 1 et 2), le TNBS/éthanol induit une inflammation colique caractérisée par des lésions macroscopiques (lot 3 ; $5,7 \pm 0,7$). Chez les rats instillés au TNBS/éthanol, le traitement par *L. farciminis* réduit de façon très significative le score lésionnel (lot 4 ; $2,6 \pm 0,4$). Cet effet n'apparaît plus lorsque le traitement par *L. farciminis* est accompagné d'une perfusion intracolique d'Hb (lot 5 ; $4,6 \pm 0,5$).

III- Conclusion

L'administration orale de *L. farciminis* réduit, de manière similaire à un traitement par le SNP, l'activité myéloperoxydase et le score lésionnel des rats traités par le TNBS/éthanol.

Ces effets anti-inflammatoires sont abolis par l'administration d'une perfusion intracolique d'hémoglobine, ce qui montre qu'ils mettent en jeu la production de NO.

EXEMPLE 2 : EFFET CURATIF DE LACTOBACILLUS FARCIMINIS SUR UNE INFLAMMATION COLIQUE PAR LE TNBS/ETHANOL

Les effets d'un traitement curatif par *L. farciminis* débutant au moment de l'induction d'une
5 l'inflammation colique par le TNBS/éthanol, ont été étudiés.

4 lots de 10 rats mâles WISTAR de 200-250 grammes sont équipés, sous anesthésie, d'un cathéter intracolique tel que décrit à l'Exemple 1.

10 A J+5, les rats reçoivent une instillation par voie intracolique de 80 mg/kg de TNBS/éthanol (lots 1 et 2) ou d'une solution NaCl 0,9% (lots 3 et 4).

Le traitement par *L. farciminis* débute 4 heures après l'induction de l'inflammation. Les rats reçoivent par
15 voie orale 10^{12} ufc/jour de *Lactobacillus farciminis* (lots 1 et 3) ou une solution NaCl 0,9% (lots 2 et 4), pendant 4 jours.

A J+4, les rats sont sacrifiés et l'intensité de l'inflammation de la paroi du côlon est caractérisée par
20 l'activité myéloperoxydase (MPO), sur des échantillons coliques isolés, tel que décrit à l'Exemple 1. Les résultats sont présentés dans la Figure 5.

Légende de la Figure 5 :

En abscisse

- 25 □ = rats non traités (lot 4)
■ = rats traités par *L. farciminis* (lot 3)
■ = rats traités par TNBS/éthanol (lot 2)
■ = rats traités par *L. farciminis* + TNBS/éthanol (lot 1)

En ordonnée = activité MPO (U MPO/g de protéines)

- 30 * : significativement différente ($P < 0,01$) du lot témoin (lot 4)
+ : significativement différente ($P < 0,01$) du lot TNBS/éthanol (lot 2)

35 L'activité myéloperoxydase est fortement augmentée chez les rats traités par le TNBS/éthanol (lot 2 ; 8184 ± 1946 U MPO/g de protéines) par rapport aux rats

contrôles non traités (lot 4 ; 76 ± 16 U MPO/g de protéines). Le traitement par *L. farciminis* n'augmente pas l'activité MPO chez les rats instillés par la solution saline (lot 3 ; 128 ± 48 U MPO/g de protéines). Au contraire, le traitement par
5 *L. farciminis* des rats instillés au TNBS/éthanol (lot 1 ; 584 ± 299 U MPO/g de protéines) réduit de façon très significative l'activité myéloperoxydase.

EXEMPLE 3 : EFFET D'UN TRAITEMENT PAR LACTOBACILLUS FARCIMINIS SUR LA DOULEUR A LA DISTENSION COLORECTALE

10 Les effets d'un traitement par *L. farciminis* vis à vis de la douleur viscérale induite par distension colorectale ont été étudiés. Cette étude a été effectuée chez des rats sains (conditions basales) ou en condition d'hyperalgésie induite par une inflammation colique
15 (conditions d'inflammation) ou un stress de contrainte (conditions de stress). La douleur à la distension se manifeste par l'augmentation du nombre de contractions des muscles abdominaux (MORTEAU et al., Dig. Dis. Sci., 39, 1239-1248, 1994).

20 Pendant 21 jours, 7 lots de 10 rats mâles WISTAR de 200-250 grammes reçoivent par voie orale 10^{12} ufc/jour de *Lactobacillus farciminis* (lots 2, 4 et 7) ou une solution NaCl 0,9% (lots 1, 3, 5 et 6).

A J+7, les rats sont équipés, sous anesthésie,
25 d'un cathéter intracolique (+ 2cm de la jonction caeco-colique) et 3 groupes de 3 électrodes en NiCr sont implantés de chaque côté du muscle oblique externe abdominal juste au-dessus du ligament inguinal. Le cathéter et les électrodes sont accessibles de l'extérieur au niveau de la région dorso-
30 scapulaire et protégés par un tube en verre fixé à la peau.

I- Effet d'un traitement par *L. farciminis* en conditions basales

A J+15, une distension colorectale est réalisée à l'aide d'un ballon inséré par voie rectale, à 5 cm de l'anus
35 et fixé à la queue de l'animal. Le ballon est gonflé progressivement de 0 à 60 mm Hg, par étapes de 15 mm Hg,

chaque étape durant 5 minutes. Les contractions du muscle abdominal sont enregistrées avec un électroencéphalographe pour visualiser la sensibilité viscérale. Les résultats sont illustrés par la Figure 6.

5 Légende de la Figure 6 :

En abscisse = pression de distension (mm Hg)

En ordonnée = nombre de crampes abdominales/5 min

* : significativement différent ($P < 0,05$) du lot témoin (lot 1)

10 Lots de rats utilisés :

◆ = rats non traités (lot 1)

□ = rats traités par *L. farciminis* (lot 2)

La distension colorectale progressive augmente le nombre des contractions du muscle abdominal en fonction du volume de distension, que les rats aient été traités par *L. farciminis* (lot 2) ou non (lot 1). Cependant, quel que soit le volume de distension, le nombre des contractions du muscle abdominal est diminué chez les rats traités par *L. farciminis* (lot 2) par rapport aux rats non traités (lot 1).

20 **II- Effet d'un traitement par *L. farciminis* en conditions d'inflammation.**

A J+17, les rats reçoivent l'instillation intracolique de 80 mg/kg de TNBS/éthanol (lots 3 et 4) ou une solution NaCl 0,9% (lot 1).

25 A J+21, soit 4 jours après l'instillation intracolique, une nouvelle session de distensions colorectales est réalisée comme décrit ci-dessus. Les contractions du muscle abdominal sont enregistrées avec un électroencéphalographe pour visualiser la sensibilité viscérale. Les résultats sont illustrés par la Figure 7.

30 Légende de la Figure 7 :

En abscisse = pression de distension (mm Hg)

En ordonnée = nombre de crampes abdominales/5 min

* : significativement différent ($P < 0,05$) du lot témoin (lots 1 et 3)

35

Lots de rats utilisés :

◆ = rats non traités (lot 1)

□ = rats traités par TNBS/éthanol (lot 3)

▲ = rats traités par *L. farciminis* +
TNBS/éthanol (lot 4)

Le nombre des contractions du muscle abdominal est augmenté de façon significative 4 jours après l'instillation de TNBS/éthanol chez les rats non traités par *L. farciminis* (lot 3) par rapport aux rats contrôles (lot 1).

Le nombre des contractions du muscle abdominal est diminué de façon significative 4 jours après l'instillation de TNBS/éthanol chez les rats traités par *L. farciminis* (lot 4) par rapport aux rats ayant reçu le TNBS/éthanol mais non traités par *L. farciminis* (lot 3) et n'est pas significativement différent de celui des rats contrôles (lot 1).

III- Effet d'un traitement par *L. farciminis* en conditions de stress

A J+15 les rats sont soumis à un stress de contrainte (lots 6 et 7). Sous anesthésie légère à l'éther, le thorax et les membres antérieurs des rats sont entourés de ruban adhésif de manière à limiter leurs mouvements. Ils sont maintenus dans cette position pendant 2 heures. Les animaux témoins n'ont été soumis qu'à l'anesthésie à l'éther (lot 5).

Vingt minutes après le stress de contrainte, une session de distensions colorectales est réalisée comme décrit ci-dessus. Les contractions du muscle abdominal sont enregistrées avec un électroencéphalographe pour visualiser la sensibilité viscérale. Les résultats sont illustrés par la Figure 8.

Légende de la Figure 8 :

En abscisse = pression de distension (mm Hg)

En ordonnée = nombre de crampes abdominales/5 min

* : significativement différent ($P < 0.05$) du lot témoin (lot 5)

Lots de rats utilisés

◆ = rats témoins non traités et non stressés
(lot 5)

□ = rats non traité et stressés (lot 6)

5 ▲ = rats traités par *L. farciminis* et stressés
(lot 7)

Le nombre de contractions abdominales correspondant à des distensions colorectales de 45 et 60 mm Hg est augmenté de façon significative après stress chez les rats non traités par *L. farciminis* (lot 6) par rapport aux rats contrôles (lot 5). Pour les pressions de 45 et 60 mm Hg, le nombre de contractions abdominales chez les rats traités par *L. farciminis* et stressés (lot 7) est significativement diminué par rapport aux animaux non traités et stressés (lot 6) et n'est pas significativement différent de celui des animaux contrôles non traités et non stressés (lot 5).

IV- Conclusion

Ces résultats montrent qu'un traitement par *L. farciminis*, en conditions basales ou d'hyperalgésie induite par une inflammation colique ou un stress de contrainte, réduit le nombre de contractions des muscles abdominaux, indiquant une diminution de la douleur viscérale.

REVENDEICATIONS

1) Utilisation de bactéries lactiques de l'espèce *Lactobacillus farciminis* pour l'obtention d'une composition destinée au traitement ou à la prévention d'une pathologie du tube digestif.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite pathologie est une pathologie inflammatoire aiguë ou chronique de l'intestin.

3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite pathologie se manifeste par des douleurs viscérales.

4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un aliment ou d'un complément alimentaire.

5) Composition pour le traitement de pathologies du tube digestif, caractérisée en ce qu'elle comprend des bactéries lactiques de l'espèce *L. farciminis*.

1/8

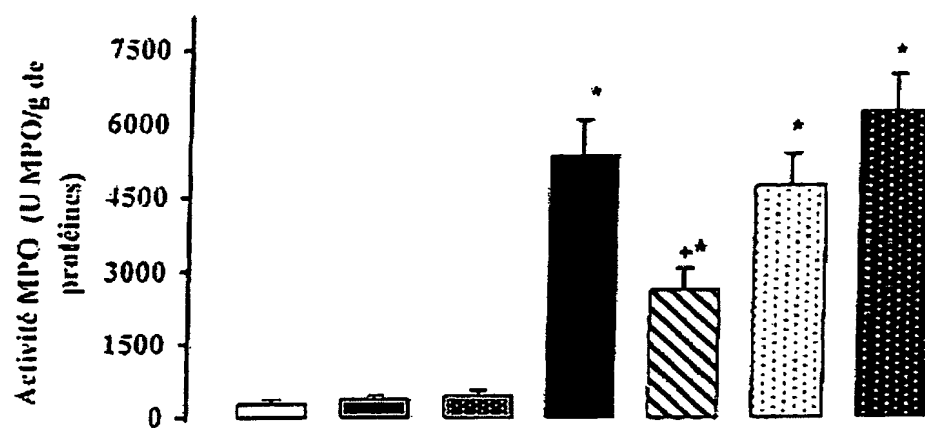


FIG. 1

2/8

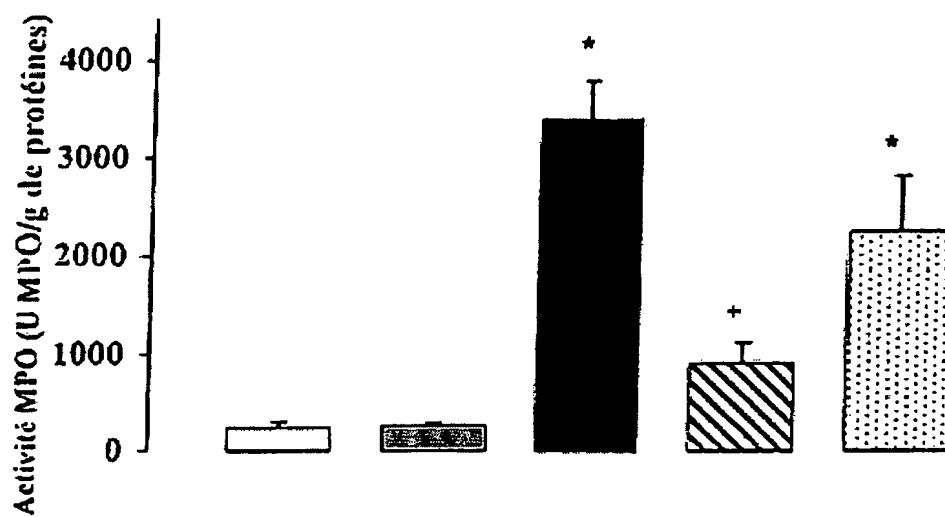


FIG. 2

3/8

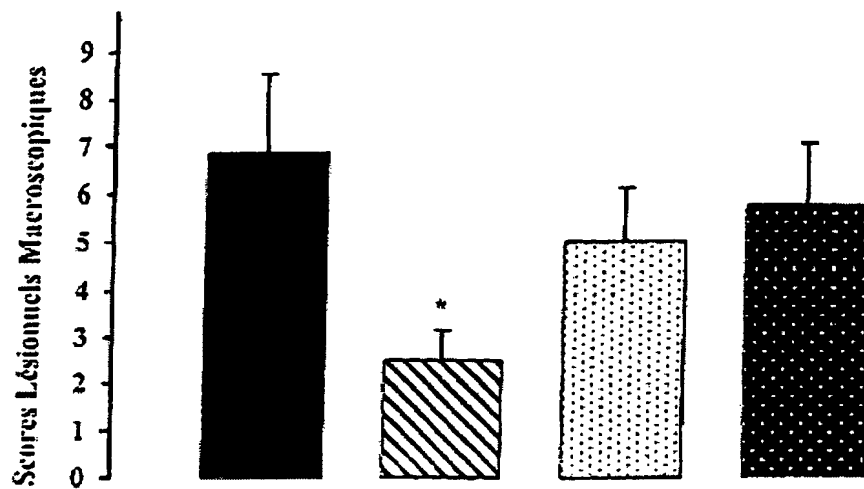


FIG. 3

4/8

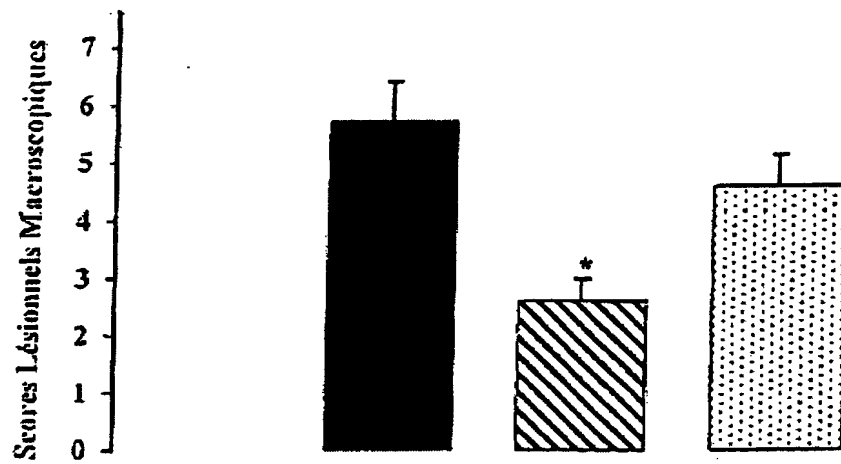


FIG. 4

5/8

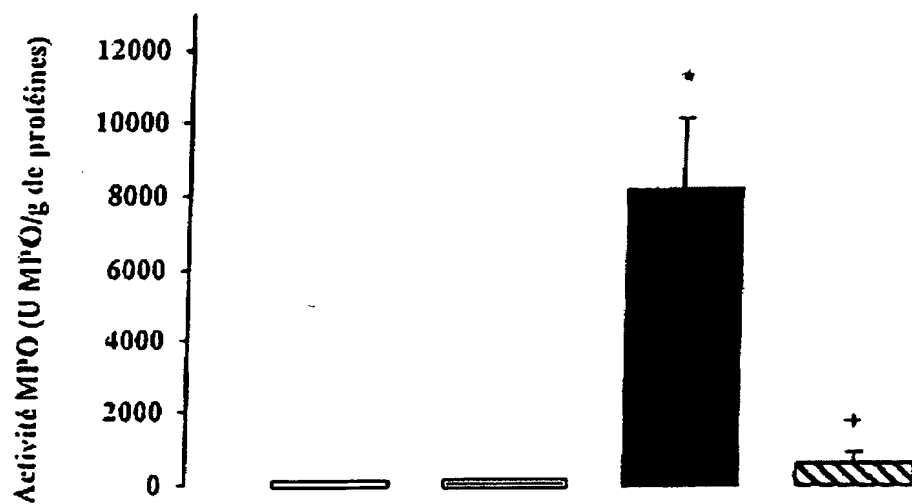


FIG. 5

6/8

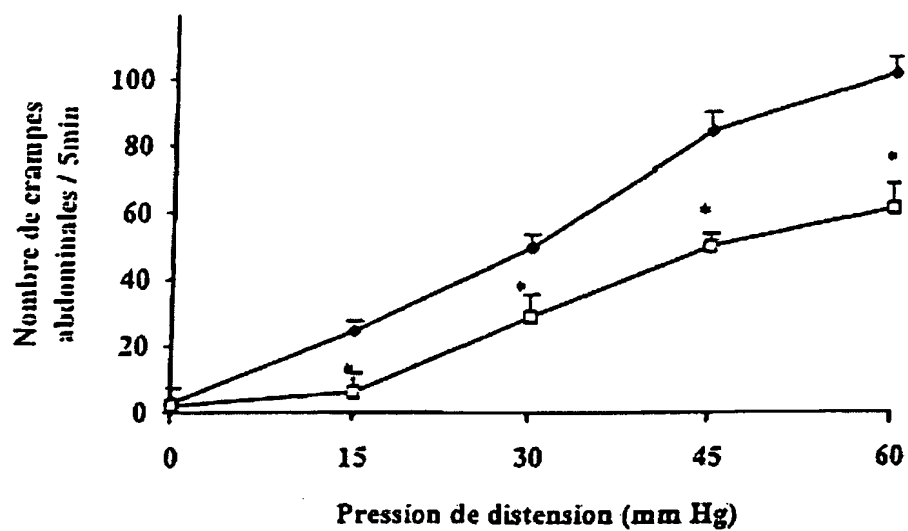


FIG. 6

7/8

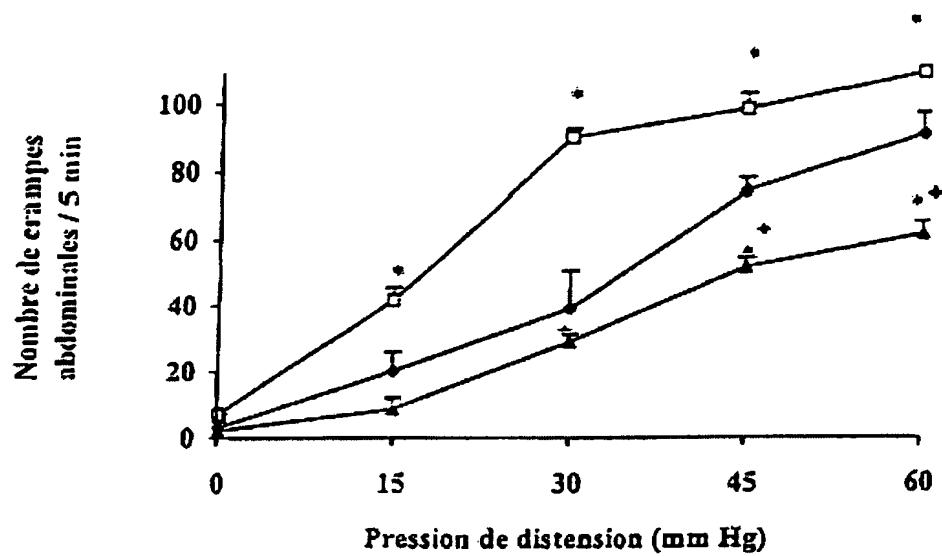


FIG. 7

8/8

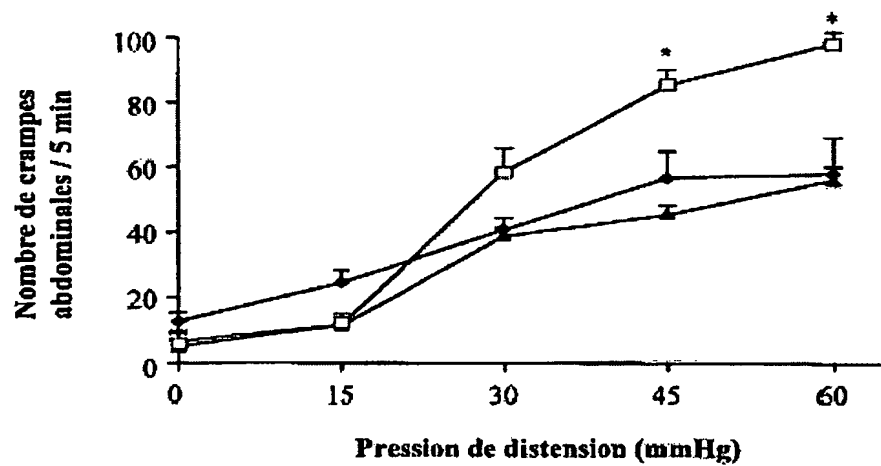


FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 03/00903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A23L1/03 A61P1/00 A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 28943 A (GERVAIS DANONE CO ;POSTAIRE ERIC (FR); CAYUELA CHANTAL (FR); DUGAS) 25 May 2000 (2000-05-25) cited in the application page 1, line 1 - line 3; claims 2-6 page 4, line 28 -page 5, line 27 ---	1-5
Y	G. WOLF ET AL.: "Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, vol. 10, no. 3/4, 1990, pages 323-329, XP008012874 Amsterdam, NL cited in the application the whole document ---	1-5
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2003

Date of mailing of the international search report

08/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. J. Application No

PCT/FR 03/00903

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 27991 A (LEGRAND CHARLES GABRIEL ;ROUSSEL EDMOND DANIEL (FR); STANDA LAB SA) 2 July 1998 (1998-07-02) cited in the application page 21, line 11 -page 23, last line; claims page 26, last paragraph ---	1-5
Y	D.-M. MCCAFFERTY ET AL.: "Inducible nitric oxide synthase plays a crucial role in resolving intestinal inflammation" GASTROENTEROLOGY, vol. 112, no. 3, 1997, pages 1022-1027, XP002228823 page 1025, left-hand column, last paragraph -page 1026, left-hand column, last line ---	1-5
A	WO 98 42200 A (GARREAU JEAN JAMES) 1 October 1998 (1998-10-01) claims ---	1-5
A	R. KORHONEN ET AL.: "Induction of nitric oxide synthesis by probiotic Lactobacillus rhamnosus GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells." INFLAMMATION, vol. 25, no. 4, August 2001 (2001-08), pages 223-232, XP008012977 cited in the application page 228, right-hand column, last paragraph -page 230, left-hand column, last line -----	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/00903

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0028943	A	25-05-2000	FR 2785809 A1 AU 1276300 A CA 2351982 A1 EP 1131080 A2 WO 0028943 A2	19-05-2000 05-06-2000 25-05-2000 12-09-2001 25-05-2000
WO 9827991	A	02-07-1998	FR 2764801 A1 FR 2764802 A1 AU 5669098 A BR 9714179 A CN 1245432 A DE 69711084 D1 DE 69711084 T2 DK 951290 T3 EP 0951290 A1 ES 2174330 T3 WO 9827991 A1 FR 2764803 A1 JP 2001507015 T PL 334277 A1 RU 2204400 C2 TR 9901447 T2	24-12-1998 24-12-1998 17-07-1998 29-02-2000 23-02-2000 18-04-2002 07-11-2002 08-07-2002 27-10-1999 01-11-2002 02-07-1998 24-12-1998 29-05-2001 14-02-2000 20-05-2003 22-11-1999
WO 9842200	A	01-10-1998	WO 9842200 A1 AU 2296897 A	01-10-1998 20-10-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/00903

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K35/74 A23L1/03

A61P1/00

A61P29/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A23L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WO 00 28943 A (GERVAIS DANONE CO ;POSTAIRE ERIC (FR); CAYUELA CHANTAL (FR); DUGAS)</p> <p>25 mai 2000 (2000-05-25)</p> <p>cité dans la demande</p> <p>page 1, ligne 1 - ligne 3; revendications 2-6</p> <p>page 4, ligne 28 -page 5, ligne 27</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-5

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/08/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/00903

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>G. WOLF ET AL.: "Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, vol. 10, no. 3/4, 1990, pages 323-329, XP008012874 Amsterdam, NL cité dans la demande le document en entier ---</p>	1-5
Y	<p>WO 98 27991 A (LEGRAND CHARLES GABRIEL ; ROUSSEL EDMOND DANIEL (FR); STANDA LAB SA) 2 juillet 1998 (1998-07-02) cité dans la demande page 21, ligne 11 -page 23, dernière ligne; revendications page 26, dernier alinéa ---</p>	1-5
Y	<p>D.-M. MCCAFFERTY ET AL.: "Inducible nitric oxide synthase plays a crucial role in resolving intestinal inflammation" GASTROENTEROLOGY, vol. 112, no. 3, 1997, pages 1022-1027, XP002228823 page 1025, colonne de gauche, dernier alinéa -page 1026, colonne de gauche, dernière ligne ---</p>	1-5
A	<p>WO 98 42200 A (GARREAU JEAN JAMES) 1 octobre 1998 (1998-10-01) revendications ---</p>	1-5
A	<p>R. KORHONEN ET AL.: "Induction of nitric oxide synthesis by probiotic Lactobacillus rhamnosus GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells." INFLAMMATION, vol. 25, no. 4, août 2001 (2001-08), pages 223-232, XP008012977 cité dans la demande page 228, colonne de droite, dernier alinéa -page 230, colonne de gauche, dernière ligne -----</p>	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/00903

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0028943	A	25-05-2000	FR 2785809 A1	19-05-2000
			AU 1276300 A	05-06-2000
			CA 2351982 A1	25-05-2000
			EP 1131080 A2	12-09-2001
			WO 0028943 A2	25-05-2000
WO 9827991	A	02-07-1998	FR 2764801 A1	24-12-1998
			FR 2764802 A1	24-12-1998
			AU 5669098 A	17-07-1998
			BR 9714179 A	29-02-2000
			CN 1245432 A	23-02-2000
			DE 69711084 D1	18-04-2002
			DE 69711084 T2	07-11-2002
			DK 951290 T3	08-07-2002
			EP 0951290 A1	27-10-1999
			ES 2174330 T3	01-11-2002
			WO 9827991 A1	02-07-1998
			FR 2764803 A1	24-12-1998
			JP 2001507015 T	29-05-2001
			PL 334277 A1	14-02-2000
			RU 2204400 C2	20-05-2003
			TR 9901447 T2	22-11-1999
WO 9842200	A	01-10-1998	WO 9842200 A1	01-10-1998
			AU 2296897 A	20-10-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.